

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

Abstract (Basic): WO 8906538 A

Prodn. of therapeutic compsns. from non-haemolysed defibrinated mammalian blood is effected by (a) hydrolysing the blood with activated papain at pH 6.5-7.4, (b) stopping the reaction by cooling, (c) removing papain and other proteins by ultrafiltration with a mol. wt. cut-off of 10,000, (d) concentrating the permeate to 1/25-1/35 of the vol. of blood, and (e) adding an alcohol, allowing to stand at low temp. for at least 24 hrs., and filtering.

USE - Compsns. are useful for promoting wound healing and for treating geriatric disorders, esp. for improving cerebral and peripheral arterial blood flow. They promote respiration of liver cells without activating tumour cells.

0/6

Title Terms: THERAPEUTIC; COMPOSITION; PRODUCE; BLOOD; PAPAIN; HYDROLYSIS; ULTRAFILTER

Derwent Class: B04

International Patent Class (Additional): A61K-035/14

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04D; B12-A07; B12-C10; B12-E01; B12-G02

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M720 M903 N134 N425 N460 N511 N513 P448 P520 P942 V600 V615

AP

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>4</sup> :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/ 06538
A61K 35/14		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Juli 1989 (27.07.89)

(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/AT89/00003	(74) Anwälte: BOECKMANN, Peter usw.; Strohgasse 10, A-1030 Wien (AT).
(22) Internationales Anmeldedatum:	13. Januar 1989 (13.01.89)	
(31) Prioritätsaktenzeichen:	A 61/88	(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), US.
(32) Prioritätsdatum:	13. Januar 1988 (13.01.88)	
(33) Prioritätsland:	AT	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ):	GERBRO BROSCHEK KG PHARMAZEUTISCHE FABRIK [AT/AT]; Bahnhofsbichl 13, A-6391 Fieberbrunn (AT).	
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ):	HANTICH, Gerhard [AT/AT]; Stockerdörfel 25, A-6370 Kitzbühel (AT). KRENAUER, Johanna [AT/AT]; Gruberau 38, A-6391 Fieberbrunn (AT). EISENREICH, Volker [AT/AT]; Rosenegg 73, A-6391 Fieberbrunn (AT). HESSE, Ernst [AT/AT]; Reitliftweg 18, A-6391 Fieberbrunn (AT).	Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING A THERAPEUTICALLY ACTIVE INGREDIENT, IN PARTICULAR FOR CICATRIZATION OR FOR TREATMENT IN GERIATRY, AND A THERAPEUTIC PREPARATION CONTAINING SAID ACTIVE INGREDIENT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES THERAPEUTISCH AKTIVEN, INSBESONDERE ZUR WUNDHEILUNG ODER ZUR BEHANDLUNG IN DER GERIATRIE VERWENDBAREN WIRKSTOFFES UND EIN EINEN SOLCHEN WIRKSTOFF ENTHALTENDES THERAPEUTISCHES PRÄPARAT

(55) Abstract

In a process for producing a therapeutically active ingredient, in particular for cicatrization or treatment of cerebro-vascular insufficiency, defibrinated blood of young bovines or calves is subjected to enzymatic papain hydrolysis at a pH of 6.5 to 7.4. The reaction is stopped with cold water and ultrafiltration up to 10 000 D is carried out. The filtrate is concentrated, mixed with alcohol, allowed to stand for at least 24 h and then filtered. The preparations obtained possess appreciably improved cicatrizing and geriatric activities.

(56) Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Herstellung eines therapeutisch aktiven Wirkstoffes, der insbesondere zur Wundheilung oder zur Behandlung cerebravaskulärer Insuffizienz verwendbar ist, verwendet das defibrinierte Blut junger Rinder oder Kälber, das einer enzymatischen Papainhydrolyse bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,4 unterworfen wird. Die Reaktion wird mit kaltem Wasser abgestoppt und sodann eine Ultrafiltration bis 10.000 D durchgeführt. Sodann wird das Filtrat eingeeignet und mit Alkohol versetzt, mindestens 24 Stunden gekühlt stehengelassen und klarfiltriert. Die erhaltenen Präparate haben erheblich verbesserte wundheilende und geriatrische Wirkungen.

AP

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

1           Verfahren zur Herstellung eines therapeutisch aktiven, insbesondere zur Wundheilung oder zur Behandlung in der Geriatrie verwendbaren Wirkstoffes und ein einen solchen Wirkstoff enthaltendes therapeutisches Präparat

5           Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines therapeutisch aktiven, insbesondere zur Wundheilung oder zur Behandlung in der Geriatrie verwendbaren, Wirkstoffes, bei welchem defibriniertes Blut von warmblütigen Säugetieren, insbesondere von jungen Rindern oder Kälbern, einer enzymatischen Hydrolyse mit Papain 10 unterworfen, filtriert, das Permeat eingeengt und mit Alkohol, vorzugsweise Äthanol, behandelt wird.

15          Seit vielen Jahren sind zahlreiche Verfahren bekannt, um aus Blut bzw. Blutfaktionen oder aus Organhomogenisaten von Säugetieren oder Menschen Präparate mit wundheilenden, zellatmungsaktiven bzw. stoffwechsel- und wachstumfördernden Eigenschaften zu extrahieren. Vielfach war die genaue Zusammensetzung dieser Präparate weitgehend ungeklärt, doch hatte sich die Wirkung derselben zur Behandlung schlecht heilender Wunden, wie von Verbrennungen, Ulcus cruris u.dgl., oder zur Verbesserung der Cerebraldurchblutung als günstig erwiesen.

20          Ein gemeinsames Merkmal der Herstellungsverfahren dieser Präparate besteht meist darin, defibriniertes, häufig auch hämolysiertes Blut von in der Regel jungen Schlachttieren, vor allem Kälbern, jungen Rindern oder Pferden, auf übliche Weise von Zellsubstanzen, Mineralstoffen und/oder Eiweiß zu befreien und die Extrakte als ganzes 25 oder Fraktionen derselben einzusaugen und als Wirkstoffpräparate zu formulieren. Die Enteiweißung oder Deproteinisierung erfolgt bei den bekannten Verfahren durch Erhitzen oder Zentrifugieren oder Filtrieren oder aber durch Einwirkung von Säuren oder Alkoholen und anschließende Zentrifugation und/oder Filtration der ausgefällten Proteine.

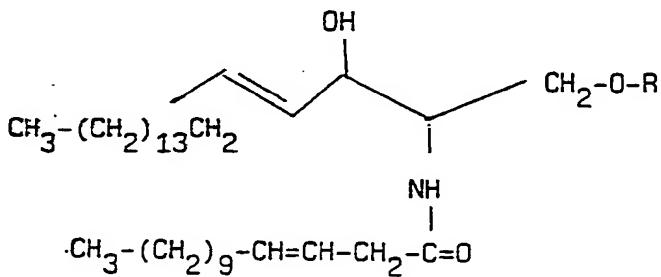
30          Eine Deproteinisierung durch Erhitzen und anschließende Filtration mit Hilfe eines Membrantrennverfahrens wird in der EP-A 95 170 beschrieben, wobei als Membrantrennverfahren eine kontinuierliche mehrstufige Ultrafiltration unter Verwendung von Membranen mit einer Molekularausschlußgrenze von über etwa 8000 Dalton angewendet und die teilweise Abtrennung der anorganischen Salze durch Elektrodialyse mit Membranen einer Durchlässigkeit bis zu etwa 300 Dalton durchgeführt wird.

- 2 -

1 Die EP-A 140 134 beschreibt ein ähnliches Verfahren zur Herstellung  
eines biologisch aktiven Extraktes aus Organen von Säugetieren und aus  
Zellkulturen, bei welchem das Ausgangsmaterial unter Aufschluß der  
Zellen zerkleinert, rasch auf eine Temperatur von 70 bis 90° erhitzt,  
5 abgekühlt, zentrifugiert, aus der erhaltenen Lösung durch  
Ultrafiltration die Substanzen mit einem Molekulargewicht von über  
10.000 D entfernt und der verbleibenden Lösung durch Elektrodialyse die  
Salzionen entzogen werden. Als Beispiele für das Ausgangsmaterial für  
dieses Verfahren werden Thymus, Milz, Leber und andere Organe, aber auch  
10 das Blut von Säugetieren, erwähnt.

Aus der AT-PS 274 240 ist es bekannt, hämolysierte Blutkörperchen vom Blut junger Säugetiere, gegebenenfalls nach vollständiger Trocknung oder teilweiser Einengung auf höheren Trockenmassegehalt, mittels Ionen austauscherverfahren, Absorptionschromatographie, Hochspannungselektrophorese, Hochspannungsdialyse, Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie oder Gegenstromverteilung in Fraktionen aufzutrennen, von denen diejenige mit einem UV-Maximum bei 245 bis 246  $\mu$  zur Isolierung des Wirkstoffs herangezogen wird. Die wahlweise vor der Fraktionstrennung vorgenommene Einengung oder Trocknung kann beispielsweise durch Ultrafiltration oder durch Sprühtrocknung erfolgen.

Schließlich ist es noch aus der EP-A 38 511 bekannt, daß es sich bei biologisch aktiven, zur Wundheilung verwendbaren Substanzen, die aus Organen oder Körperflüssigkeiten von Säugetieren gewonnen werden, um Glykosphingolipide folgender Formel handelt:



worin R ein Oligosaccharid ist, welches 5 Zuckergruppen hat. Hierbei wird diese aktive Komponente durch Homogenisieren des Gewebes oder der Körperflüssigkeit des Säugers mit einer wässrigen 0,2 %-igen NaCl-Lösung, Zentrifugieren oder Filtrieren dieses Homogenisats, Ultrafiltration des erhaltenen Filtrats, Einengen des Permeats, Binden des organischen Materials aus dem konzentrierten Permeat an Aktivkohle, Desorption,

1 Reinigung desselben durch mehrfaches Chromatographieren und Elution dieser organischen Stoffe gewonnen.

Parallel zu dieser Entwicklung gibt es eine Reihe von Verfahren, bei denen zur Herstellung des biologisch aktiven Wirkstoffs das defibrinierte und gegebenenfalls hämolierte Blut vor jeder weiteren Behandlung enzymatisch hydrolysiert, d.h. einer Verdauung mit einem proteolytischen Enzym unterworfen wird. Proteinabbau-Produkte, die dann in die endgültigen Präparate eingehen, scheinen die Wirksamkeit der erhaltenen Produkte zu fördern und zu verbessern.

10 Nach der US-PS 2 912 359 wird defibriniertes und hämoliertes Blut mit proteolytischen Enzymen unter Erwärmen vorverdaut, nach dem Abkühlen zur Entsalzung dialysiert, angesäuert und der dabei erhaltene Niederschlag, der mit Lauge neutral gestellt wird, als Wirkstoff gewonnen.

15 Nach der DE-PS 1 076 888 wird defibriniertes Blut junger Schlacht-tiere fermentativ abgebaut und/oder nach einer fraktionierten Deproteinisierung mit aliphatischen Alkoholen oder Säuren zur Abtrennung der höhermolekularen Bestandteile einer Dialyse mit Wasser bzw. Alkoholen unterworfen. Das Dialysat wird, wenn nötig, von den organischen Lösungs-mitteln befreit und schonend eingeengt.

20 In der DE-OS 2 349 186 wird vorgeschlagen, das nach der obigen DE-PS 1 076 888 erhaltene Präparat mit einem physiologisch verwendbaren Säure-additionssalz von Heptaminol-(6-Amino-2-methylheptan-2-ol) zu versetzen, um die Wirkung des Präparates zu potenzieren.

25 Es ist auch ein Verfahren der eingangs geschilderten Art bekannt (DE-OS 1 949 195), bei welchem die enzymatische Verdauung bei einem pH-Wert von 5 bis 5,5 vorgenommen wird, worauf durch Erwärmung auf etwa 80°C und anschließende Filtration eine teilweise Deproteinisierung er-folgt. Da hiebei keine völlige Enteiweißung zu erreichen ist, wird noch eine zweite Enteiweißungsstufe verwendet, welche thermisch in 30 Anwesenheit von Papain geführt wird. Dieses Verfahren ist kompliziert und langwierig und schwierig durchzuführen. Im Endprodukt besteht eine relativ hohe Trübungsneigung, wenn die Präparate in flüssiger Form aufbewahrt werden, die Ausbeuten sind in Bezug auf das eingesetzte Blut nicht allzu günstig und die Wirksamkeit des Wirkstoffes selbst scheint 35 nicht überall in der gewünschten Weise gegeben.

Die Erfindung hat sich zur Aufgabe gestellt, diese Nachteile der bekannten Verfahren zu vermeiden, die Trübungsneigung zu beseitigen und

1 die Ausbeute und die Wirksamkeit des Wirkstoffes bei verbesserter  
Verfahrensökonomie zu steigern. Erfindungsgemäß wird hiezu  
vorgeschlagen, daß die Papainhydrolyse an unhämolysiertem Blut mit  
aktiviertem Papain bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,4 vorgenommen wird,  
5 daß anschließend die Reaktion durch Abkühlung gestoppt wird, daß zur  
Entproteinisierung und zur Entfernung des Papains bis 10.000 D  
ultrafiltriert wird und daß sodann das im Wesentlichen proteinfreie  
Permeat auf 1/25 bis 1/35, bezogen auf das eingesetzte Blut, eingeeengt  
und mit Alkohol versetzt mindestens 24 Stunden gekühlt stehengelassen  
10 und schließlich klarfiltriert wird.

Im Gegensatz zum zuletzt beschriebenen bekannten Verfahren wird  
eine enzymatische Hydrolyse an nicht hämolysiertem Blut durchgeführt und  
keine Wärmebehandlung angewendet, solange noch Eiweiß in der Lösung ist.  
Vielmehr kommt es beim erfindungsgemäßen Verfahren zu einer Erwärmung  
15 lediglich bei der Einengung und gegebenenfalls noch bei einer  
Sterilisation des Endproduktes, wobei es jedoch in beiden Fällen zu  
keiner Veränderung des Produktes kommt. Während beim bekannten Verfahren  
durch nachgeschaltete Säulentrennung auf aufwendige Weise eine weitere  
Befreiung von unerwünschten Substanzen durchgeführt wird, ist dies beim  
20 erfindungsgemäßen Verfahren nicht notwendig, was ein Grund für die  
unterschiedliche Wirksamkeit sein mag. Während beim bekannten Verfahren  
das Endprodukt ein Maximum der Molekulargewichtsverteilung im Bereich  
von etwa 350 bis 400 hat, liegt beim erfindungsgemäßen Verfahren das  
Molekulargewichtsmaximum wesentlich niedriger als 300.

25 Die Molekulargewichtsverteilung des Endproduktes des erfindungsgemäßen  
Verfahrens weicht daher von jener bekannter Produkte wesentlich  
ab. Auch dies mag ein Grund für die unterschiedliche Wirksamkeit sein.  
Ein weiterer Grund hiefür dürfte aber auch darin liegen, daß beim er-  
findungsgemäßen Verfahren als Ausgangspunkt im wesentlichen  
30 unhämolysiertes Blut verwendet wird, welches also die roten Blutkör-  
perchen noch unzerstört enthält. Eine geringfügige Hämolyse, welche etwa  
beim Tieffrieren des Blutes eintritt, ist auf das erfindungsgemäße Ver-  
fahren ohne Belang und hat keinen Einfluß auf das Endprodukt, wie Un-  
tersuchungen bewiesen haben. Die beim erfindungsgemäßen Verfahren  
35 mittels der Ultrafiltration durchgeführte Enteiweißung, bei welcher auch  
das Papain entfernt wird, da dessen Molekulargewicht größer ist als  
20.000, entfernt auch das Hämoglobin (Molekulargewicht größer als 50000),

1 so daß zum Zeitpunkt des Alkoholzusatzes kein Eiweiß (Protein) mehr in  
der Lösung enthalten ist, da Eiweißmoleküle in der Regel ein Molekulargewicht von über 12.000 haben. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß  
5 beim erfindungsgemäßen Verfahren die Alkoholfällung zur Entfernung höherer Peptide dient, die beim bekannten Verfahren eine Trübung verursachen. Im Gegensatz hiezu bleibt beim erfindungsgemäßen Verfahren das  
10 erhaltene Produkt völlig trübungsfrei. Vorteilhaft ist auch die vereinfachte Verfahrensführung, da ein Hämolyseeschritt eingespart wird. Dies ist so zu verstehen, daß im Zuge der enzymatischen Hydrolyse mit Papain  
15 eine Hämolyse erfolgt, so daß also die beiden Schritte der Hydrolyse und der Hämolyse in einem erfolgen. Ein späterer Wasserzusatz zur Erleichterung der Ultrafiltration bzw. zur thermischen Abstoppung der Reaktion bewirkt keine wesentliche Hämolyse mehr.

20 Zudem wird ein Endprodukt erreicht, welches im Vergleich mit  
bekannten Präparaten eine gesteigerte Wundheilungswirkung aufweist.  
Außerdem wird eine vergleichsweise verbesserte Sauerstoffutilisation erreicht. Insbesondere werden die cerebrale Durchblutung und die periphere arterielle Durchblutung im Vergleich zu bekannten Präparaten gesteigert.  
Ferner liefert das erfindungsgemäße Verfahren überraschend hohe Ausbeuten bezogen auf die eingesetzte Blutmenge und ist verfahrenstechnisch  
25 äußerst wirtschaftlich.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Möglichkeit besteht, die klarfiltrierte Mischung auf die gewünschte Konzentration zu standardisieren, vorzugsweise durch  
30 Verdünnung.

35 Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird vorzugsweise defibriniertes Blut von Schlachttieren, insbesondere von Kälbern oder jungen Rindern (bis maximal 3 Jahre) als Ausgangsmaterial verwendet. Dieses Blut wird mit einer aktivierten Papainlösung vorverdaut. Hierbei wird zur Vorbehandlung handelsübliches Papain in destilliertem Wasser suspendiert und durch Zentrifugieren von etwaigen Feststoffen befreit. Handelsübliches Papain hat ein ungefähres Molekulargewicht von 25.000, es enthält aber auch niedermolekulare Substanzen mit einem Molekulargewicht bis unter 10.000. Um zu vermeiden, daß diese niedermolekularen Stoffe aus dem  
40 Papain in das endgültige Wirkstoffkonzentrat gelangen, wird die wässrige Suspension ultrafiltriert. Das Konzentrat wird dann mit Cysteinlösung versetzt, wodurch das Papain aktiviert und als Inkubationslösung ver-

1 wendet wird.

Das Blut, das gegebenenfalls in gefrorener Form aufbewahrt war und  
in diesem Fall vorher aufgetaut wird, wird im Inkubationskessel auf 35 -  
42°C erwärmt, der pH Wert mit 1 N HCl auf 6,5 - 7,4 eingestellt und mit  
5 der Inkubationslösung vorzugsweise etwa 14 bis 18 h inkubiert. Das  
fertig inkubierte Blut wird mit frischem aqua dest.ad inject mit einer  
Temperatur von 0 - 10°C kalt versetzt, wodurch die enzy-  
matische Hydrolyse bzw. Vorverdauung unterbrochen und die Masse für die  
10 Ultrafiltration verdünnt wird. Vor der Ultrafiltration wird zum Schutz  
des Ultrafilters meist vorfiltriert, um Teilchen mit einer Größe von >  
50 µm abzutrennen.

Anschließend erfolgt die Ultrafiltration, während welcher in  
regelmäßigen Abständen Proben zur Überprüfung der Filterdichtheit  
mittels Trichloressigsäurefällung gezogen werden. Die Ergebnisse müssen  
15 negativ sein. Durch die Ultrafiltration wird praktisch das gesamte  
Eiweiß aus der Lösung entfernt. Dies konnte durch eine Mole-  
kulargewichtsbestimmung mittels einer SDS-Gelelektrophorese bestätigt  
werden. Zweckmäßig wird ab der Ultrafiltration unter aseptischen  
Bedingungen weitergearbeitet.

20 Das erhaltene Permeat wird so rasch wie möglich im  
Vakuumverdampfer bei 60 - 80°C auf 1/25 - 1/33 des ursprünglichen  
Blutvolumens eingeengt. Dabei kommt es wieder zu Ausfällungen, die über  
ein Filter abfiltriert werden. Doch wird durch diese starke Einengung  
25 die Wahrscheinlichkeit von Nachfällungen weitgehend herabgesetzt. Das  
filtrierte Konzentrat wird nun mit einer etwa 2 1/2-fachen Volumsmenge  
vorgekühlten 96%-igen Äthanols versetzt und in der Kälte, vorzugsweise  
bei Kühlraumtemperatur (4 - 6°C), stehen gelassen. Anstelle von Äthanol  
kann auch Methanol, Propanol oder Butanol verwendet werden. Nach einer  
30 Stehzeit von mindestens 24 h, vorzugsweise etwa 48 h, wird  
klarfiltriert, was mit Hilfe eines Schwarzbandfilters erfolgen kann. Der  
zur Fällung zugesetzte Alkohol wird dann im Rotavapor abdestilliert.  
Dabei kommt es meist nochmals zu einer Ausfällung, die über Schwarzband-  
und Glasfaservorfilter klarfiltriert wird.

35 Durch die starke Einengung vor der Alkoholfällung wird es möglich,  
nur mehr eine Trockengewichtseinstellung auf etwa 200 mg/ml durch Ver-  
dünnung mit der entsprechenden Menge frischen Wassers für  
Injektionszwecke durchzuführen.

1. Das fertige Wirkstoffkonzentrat wird über ein Sterilfilter und nochmals durch ein Ultrafilter filtriert und anschließend in sterile Flaschen abgefüllt. Im Allgemeinen ist die Sterilfiltration im Hinblick auf eine Keimentfernung stets erforderlich, wenn der Alkohol abgezogen  
5 wird. Die Klarfiltration erfolgt zur Entfernung der Ausfällungen.

Durch die Ultrafiltration vor der Alkoholfällung wird vermieden, daß unwirtschaftlich große Alkoholmengen eingesetzt werden. Die Manipulation kleinerer Mengen ist stets einfacher und daher billiger.

10 Durch die Alkoholfällung werden aus der Lösung höhere Peptide abgetrennt, welche im Endprodukt durch Agglomeratbildung Ausfällungen bzw. Trübungen verursachen könnten. Es wird dabei ein Produkt erhalten, das im flüssigen Zustand äußerst stabil ist und keinerlei Nachfällungen im pharmazeutischen Endprodukt zeigt, auch wenn dieses bei höheren Temperaturen, z.B. etwa 120°C, autoklavisiert wird.

15 Die Einengung auf mindestens 1/25 - 1/33 des ursprünglichen Blutvolumens erfolgt, um das Produkt nach der Alkoholfällung nicht mehr weiter einengen zu müssen. Es wird daher nach der Alkoholfällung nur mehr der Alkohol abgedampft und die Masse auf das entsprechende Trockengewicht verdünnt.

20 Obwohl eine Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Gelelektrophorese für Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 negativ ausfällt, ist es vorteilhaft, zum Abschluß noch eine zweite Ultrafiltration durchzuführen, um ein verlässlich sauberes, steriles und pyrogenfreies Endprodukt zu erhalten. Verluste hinsichtlich 25 der Ausbeute treten hiebei nicht auf.

Es hat sich herausgestellt, daß es ohne Zwischenschaltung einer Alkoholfällung bei längerer Lagerung des Wirkstoffes oder der verdünnten Ampullenlösung zu Trübungen und Ausfällungen durch Peptid-Agglomerationen kommt, deren Bildung durch Schütteln der Lösung 30 bei 50°C oder durch Lagerung der Lösung im Kühlschrank bei 5°C auf wenige Tage verkürzt werden kann. Wird die Ultrafiltration erst nach der Alkoholfällung vorgenommen, so kann trotz der oben erwähnten Aufkonzentrierung der positive Effekt auf die Haltbarkeit ohne Trübung des Wirkstoffes nicht mehr festgestellt werden. Eine weitere Möglichkeit 35 zur Feststellung der Ausfällungstendenz besteht in der Autoklavierung des Fertigproduktes bei 121°C. Hier kommt es ohne Durchführung der Alkoholfällung zur Trübung nach einigen Tagen bis Wochen.

1 Ein weiterer Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß durch die  
 entsprechende Vorbehandlung mit Papain und die Vorerenteweißung mittels Ul-  
 trafiltration überraschenderweise ein Produkt erhalten wird, das im  
 Vergleich zu den im Handel befindlichen Präparaten wesentlich höhere  
 5 Ausbeuten an aktiver Substanz bei gleichen Blutmengen ergibt.

10 Wie bereits erwähnt, weicht die Molekulargewichtsverteilung  
 beim in erfindungsgemäßer Weise hergestellten Produkt wesentlich von je-  
 ner in bekannter Weise herstellter Produkte ab. Dies wurde durch Ver-  
 gleichsversuche festgestellt, wobei als Vergleichsprodukte folgende Pro-  
 dukte verwendet wurden:

Vergleichsprodukt I: Ein im Handel erhältliches, eiweiß- und pyro-  
 genfreies Produkt, das aus dem Blut schlacht-  
 reifer Kälber gewonnen wird.

Vergleichsprodukt II: Ein anderes, im Handel befindliches Produkt,  
 15 hergestellt im wesentlichen nach dem Verfahren  
 gemäß der DE-PS 1 076 888.

Vergleichsprodukt III: Ein Produkt hergestellt nach dem Verfahren  
 nach der DE-OS 1 949 195.

Methode:

20 Säule: TSK 2000 SW, 0,75 x 60 cm.

Vorsäule: Merck Hiber 100 Diol, 0,4 x 25 cm

Probenvolumen: 20 µl

Pumpe: LKB 2150 HPLC-Pumpe mit Rheodyne Injektor

Fluß: 0,5ml/min

25 Photometer: LKB 2138 Uvicord S, 280 nm

Schreiber: Servogor S, 30 cm/h

Molekulargewichtsstandard:

Substanz	Molekulargewicht	Retentionszeit (min)
Tyrosin	181,19	49,6
Insulin Chain a	2,660	41,8
Ovalbumin	45.000	33,5

30 Die Ergebnisse sind in Fig.1 im Vergleich zu den Meßergebnis-  
 sen des erfindungsgemäßen Produktes (IV) dargestellt. Die Diagramme  
 zeigen hiebei die volle Absorption AFS (absorption full scale) in Abhän-  
 gigkeit von der Retentionszeit RT.

35 Die Vergleichsprodukte I und II zeigen jeweils nur ein einzi-  
 ges Hauptmaximum bei einer Retentionszeit von 47,8 bzw. 48,2 min. Dies  
 entspricht einem ungefähren Molekulargewicht von 350 - 400. Das Ver-

gleichsprodukt I weist je eine Schulter bei einer Retentionszeit von 49,3 min und 56,1 min (entspricht  $\sim$  MG 200 bzw. MG <100) auf, das Vergleichsprodukt II hingegen nur eine Schulter bei RT 56,2 ( $=$  MG<100). Die gesamten beim Versuch detektierbaren Substanzen zeigen sich in einem Bereich von MG<100 bis MG $\sim$  2.500. Das Vergleichsprodukt III zeigt hingegen zwei Hauptmaxima, eines bei RT = 48,4 min (MG $\sim$  300), das zweite bei RT = 52,4 min (MG<150), und weiters im niederen MG-Bereich (<100) drei Schultern.

Das erfindungsgemäße Präparat (IV) unterscheidet sich wesentlich von den bisher genannten Substanzen. Es weist drei deutliche Maxima auf, wobei das erste Maximum in einem niedrigeren Molekulargewichtsbereich als bei den vorher genannten Präparaten liegt, nämlich ungefähr bei MG 200. Dies wird wahrscheinlich durch die zusätzliche Äthanolfällung erreicht. Die beiden anderen Maxima befinden sich bei MG <150 bzw. MG<100. Außerdem zeigt das erfindungsgemäße Präparat im niedermolekularen Bereich keine Schultern, hingegen zwei im höhermolekularen Bereich bei MG 500 bzw. MG 300.

Die in den Kurven für die Vergleichspräparate I und II links der Maxima aufscheinenden Nebenmaxima sind durch die Konservierungsmittel bedingt und gehören somit nicht zum jeweiligen Präparat.

Die genauen Meßergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1:

1. Maxima

	Retentionszeit (min)	ungefähres Molekulargewicht
--	-------------------------	-----------------------------

Vergleichspräparat I	47,8	350-400
Vergleichspräparat II	48,2	350
Vergleichspräparat III	48,4 52,4	300 150
erfindungsgemäßes Präparat IV	49,6 52,0 56,2	200 150 100

2. Schulter

	Retentionszeit (min)	ungefähres Molekulargewicht
--	-------------------------	-----------------------------

Vergleichspräparat I	49,3 56,1	100 - 200
Vergleichspräparat II	56,2	100
Vergleichspräparat III	50,6 54,9 56,4 58,8	150 - <100
erfindungsgemäßes Präparat IV	46,9 48,1	300 - 500

1 : 3. Molekulargewicht der gesamten beim Versuch detektierbaren Substanzen

	Retentionzeit (min)	ungefähres Molekulargewicht
	Vergleichspräparat I	43,0 - 58,5
5	Vergleichspräparat II	40,4 - 59,2
	Vergleichspräparat III	39,8 - 67,2
	erfindungsgemäßes Präparat IV	39,5 - 63,5

10 : Das erfindungsgemäß hergestellte Produkt wurde ferner in verschiedenen Test- und Untersuchungsreihen auf seine Wirksamkeit in therapeutischer Hinsicht geprüft. Die genauen Versuchsbedingungen werden später angegeben.

15 : Bei der Untersuchung der Wirkung des Präparats auf die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin in DNA von menschlichen Fibroblasten und Leberzellen zeigte sich, daß das Präparat im Verhältnis zu bekannten Produkten eine wesentlich stärkere (5 bis 10fache) Wirkung auf das Wachstum sowohl von Fibroblasten als auch von Leberzellen hat. Hierfür wurde die regenerierende Wirkung des erfindungsgemäß hergestellten Präparates auf menschliche Vorhaut-Fibroblasten untersucht, die durch Entzug von fötalem Kälberserum geschädigt waren. Als Ergebnis zeigte sich, daß das erfindungsgemäß Präparat unter Steigerung der DNA-Synthese eindeutig regenerierend auf geschädigte menschliche Fibroblastenzellen wirkt und daß dabei die Konzentrationsbereiche ebenso wie der Hemmbereich ähnlich wie bei bekannten Produkten sind. Für diese Untersuchungen wurden menschliche Vorhaut-Fibroblasten in der 8. bis 10. Passage mit variablen Mengen an dem erfindungsgemäßigen Produkt bzw. dem bekannten Vergleichspräparat I versetzt und der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau in DNA gemessen. Um die Zellen zu stressen, wurden sie nach Ausplotten zunächst auf 1/2 bis 2/3 Konfluenz anwachsen gelassen und dann in künstlichem Medium ohne Zusatz von fötalem Kälberserum, einem essentiellen Mediumbestandteil, für 6 bis 9 Stunden inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt gegen ein solches, welches nur geringe Mengen fötales Kälberserum enthielt sowie steigende Mengen an erfindungsgemäßem Präparat sowie  $^3\text{H}$  markiertes Thymidin bzw. an dem Vergleichspräparat I.

355 : Dieser Ansatz wurde 12 bis 24 Stunden inkubiert und die Radioaktivität in der DNA-Faktion nach entsprechendem Aufarbeiten der Zellen bestimmt.

Fig.2 der beiliegenden Zeichnung zeigt die Ergebnisse in Diagramm-

1 form, wobei mit vollen Linien die Meßkurve für ein erfindungsgemäßes  
 Produkt dargestellt ist, mit strichlierten Linien jene für das bekannte  
 Vergleichspräparat I. Auf der Abszisse ist hiebei die Präparatzugabe in  
 Mikroliter angegeben, auf der Ordinate die radioaktive Zählungsmenge.

5 Bei der Bestimmung der regenerierenden Wirkung auf menschliche  
 Hepatoma-Zellen, die ebenfalls durch Entzug von fötalem Kälberserum  
 geschädigt worden waren, zeigte sich ebenfalls eine ausgesprochen  
 günstige Wirkung unter Steigerung der DNA-Synthese. Die Untersuchungs-  
 10 methodik entsprach jener bei der zuvor beschriebenen Fibroblastenun-  
 tersuchung, jedoch wurde die Steigerung lediglich gegenüber  
 unbehandelten Kontrollen gemessen. Fig.3 zeigt die Meßergebnisse für das  
 erfindungsgemäße Präparat.

15 Die Untersuchung der Steigerung der Zellatmung von Leberzellen,  
 welche nach der Homogenisation eine relativ geringe bzw. relativ hohe  
 Eigenatmung aufweisen, zeigte, daß das neue Präparat eine stärkere  
 Aktivierung hervorzurufen vermag als das bekannte Vergleichspräparat.  
 Im Bereich maximaler Atmungssteigerung wirken beide Präparate in  
 vergleichbarem Ausmaß. Die Messung erfolgte hiebei mittels der bekannten  
 20 Warburgmethode (beschrieben in der GB-PS 824 375). In der folgenden Ta-  
 belle sind die Meßergebnisse für drei Ansätze von verschiedenen Leber-  
 homogenaten angegeben, wobei ein Vergleich sowohl mit dem bekannten Ver-  
 gleichspräparat I durchgeführt wurde, als auch gegenüber Messungen ohne  
 Präparatzugabe.

Tabelle 2:

25	$\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch des Leberhomogenates ohne Präparatzugabe:	Steigerung des $O_2$ -Verbrauches für: erfindungsgemäßes bekanntes Präparat I: Präparat	
		14	230
	22	620	700
30	63	370	60

35 Rinderblutextrakte enthalten Faktoren, die die Zellaktivität erhöhen (z.B. Teilungsaktivität geschädigter Fibroblasten oder Zunahme des zellulären, mitochondrialen Sauerstoffsverbrauchs). Diese zellaktivierenden Effekte können z.B. im Rahmen der Wundheilung als erwünscht angesehen werden. Unerwünscht hingegen wäre die Aktivierung von neoplastischen Zellen. Untersuchungen zeigten, daß im Gegensatz zum bekannten Vergleichspräparat I das erfindungsgemäße Präparat den Sauerstoffver-

1 brauch von Tumorzellen (Mäuse-Aszitestumorzellen) nicht aktiviert. Dies wurde im folgenden Experiment überprüft, bei welchem die Sauerstoffaktivität von Mäuse-Aszitestumorzellen nach Zugabe des erfindungsgemäßen Präparates bzw. des Vergleichspräparates I untersucht wurde:

5 Messung des Sauerstoffverbrauchs: mittels "Clark"-Elektrode Suspensionspuffer:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,04 Mol/l, NaCl 0,08 Mol/l,  $\text{MgCl}_2$  0,005 Mol/l, pH 7,4 (3 ml pro Kammer); Aszitestumorzellen: nach HORNYKIEWICS und SATKE-EICHLER (Arzneimittelforschung 6, 1956) 0,1 bzw. 0,05 ml pro Kammer; erfindungsgemäßes Präparat: Injektionslösung,

10 40 mg; Trockengewicht/ml (0,2 ml/Kammer)

Vergleichspräparat I: Ampullen, Handelspräparat (0,2 ml/Kammer)

In Fig.4 sind die Ergebnisse für das erfindungsgemäße Präparat (IV) sowie für das Vergleichspräparat (I) graphisch dargestellt. Für das erfindungsgemäße Präparat IV wurde hiebei ein Mittelwert aus sechs Bestimmungen ermittelt, für das Vergleichspräparat I ein Mittelwert aus vier Bestimmungen. Es zeigt sich, daß im Gegensatz zum Vergleichspräparat I das erfindungsgemäße Präparat (IV) die Sauerstoffaktivität (zelluläre Atmung) von Mäuse-Aszitestumorzellen nicht nur nicht steigert, sondern sogar eine Verringerung der Sauerstoffaktivität bewirkt.

20 Besonders überraschend ist, daß sich beim Einsatz der erfindungsgemäß hergestellten Präparate in der Geriatrie an Patienten mit cerebralvaskulärer Insuffizienz bei einer Behandlung über vier Wochen eine deutliche Besserung bei der Flimmerfrequenzanalyse zeigt, weiters bei einem durch einen Bewertungsscore ermittelten psychischen 25 Gesamteindruck und beim geriatrischen Bewertungsschema nach Gottfries und Gottfries. Es eignet sich das neue Präparat also auch ausgezeichnet zur symptomatischen Behandlung von psychopathologischen Begleiterscheinungen der cerebralvaskulären Insuffizienz.

Weiters wurden Untersuchungen nach der WARBURG-Methode vorgenommen, um zu erfahren, inwieweit das erfindungsgemäß hergestellte Präparat tatsächlich eine Steigerung des  $O_2$ -Stoffwechsels hervorruft. Es wurde dabei das erfindungsgemäß hergestellte Präparat mit zwei handelsüblichen Produkten (Vergleichspräparat I und II) verglichen. Bei allen drei Präparaten trat eine ausgeprägte Atmungssteigerung im Rattenleberhomogenisat auf; wobei in Abhängigkeit von der Menge und/oder dem Zustand der aktiven Zellbestandteile die Ergebnisse beim einen bekannten Präparat und dem erfindungsgemäß hergestellten Präparat ähnlich bis für das erfin-

1 dungsgemäß hergestellte Präparat deutlich besser, beim anderen bekannten Präparat jedoch um bis zu 20 % herabgesetzt waren.

Es zeigte sich, daß beim nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Präparat im Vergleich zum erstgenannten bekannten Präparat 5 die 4-fache und im Vergleich zum zweitgenannten bekannten Präparat die 1,4-fache Ausbeute an Wirkstoff bei gleicher Menge eingesetzten Blutes erhalten werden konnte.

10 Schließlich wurde eine Messung des cerebralen Blutflusses bzw. der peripheren arteriellen Durchblutung (an der Oberschenkelarterie) bei Pavianen, die einem künstlichen Sauerstoffmangel ausgesetzt wurden, durchgeführt. Eine solche Messung stellt ein anerkanntes Modell zur Evaluierung von Medikamenten dar, welche die Gehirndurchblutung bzw. die arterielle Durchblutung (besonders in den Beinen), beeinflussen (Meyer J.S., Ishikawa S., Lee T.K., J. Neurosurg. 21, 524 (1964)).

15 Bei einer vergleichenden Untersuchung zeigt sich, daß das erfindungsgemäß Præparat (IV) (4 ml/kg Körpergewicht intravenös als Injektionslösung) gegenüber dem bekannten Vergleichspræparat I (4 ml/kg Körpergewicht intravenös als Injektionslösung) sowohl die cerebrale als auch die periphere Durchblutung beim Pavian deutlich stärker fördert. 20 Die Meßergebnisse sind für die cerebrale Durchblutung in Fig.5 dargestellt, für die periphere arterielle Durchblutung in Fig.6.

25 Andere Herz-Kreislauf-Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Gefäßwiderstand) änderten sich nicht oder nur geringfügig, sodaß das erfindungsgemäß hergestellte Præparat eine spezifische pharmakologische Wirkung auf die erwähnten Durchblutungsbereiche ausübt.

30 Das erfindungsgemäß hergestellte Konzentrat kann zur Verwendung in der Therapie nach an sich bekannten Methoden zu Injektionslösungen, Tabletten, Dragees, Wundsalben oder -gelen verarbeitet werden. Erfindungsgemäß therapeutische Præparate, die insbesondere Wundheilmittel oder geriatrische Præparate sein können, enthalten ein Konzentrat, gegebenenfalls nach dessen Trocknung, das nach dem zuvor beschriebenen Verfahren 35 hergestellt wurde.

35 Im folgenden werden genauere Herstellungsangaben und die Beschreibung der Untersuchungsverfahren und ihrer Ergebnisse für das erfindungsgemäß hergestellte Præparat angegeben.

Papainvorbehandlung und -aktivierung: Eine Vorbehandlung des Papains ist zweckmäßig, um unlösliche Substanzen abzutrennen und um zu

1 zu vermeiden, daß niedermolekulare Substanzen ( $M_G \leq 10.000$ ) aus dem Papain in das Wirkstoffkonzentrat gelangen.

200 g Papayotin (Fa. Extrakt-Chemie/Aktivität: 80 E/mg) werden in 1 l a.d. suspendiert und anschließend zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall 5 RC-3, Rotor: HG-4L: 3.000 rpm. 20 min).

Vorfiltration für Ultrafiltration (die Lösung soll frei von Teilchen  $> 10 \mu\text{m}$  sein) über: Schwarzbandfilter oder Rundfilter 595, Glasfaservorfilter (Fa. Sartorius), 8  $\mu\text{m}$  Membranfilter (Fa. Sartorius)

Ultrafiltration: Gerät Pellicon Kassettenystem Fa. Millipore NMG: 10.000

10. Probevolumen nach Zentrifugation und Vorfiltration  $\rightarrow 0,77$  l

Konzentratvolumen: 0,38 l

Durchflußrate: 60 ml/min

Das Konzentrat wird mit Cysteinlösung (3 g Cystein in 0,62 l a.d.) auf 1 l verdünnt = aktivierte Papainlösung (= Inkubationslösung)

15 Zur erfindungsgemäßen Herstellung der neuen Wirkstoffe wird nun folgendermaßen vorgegangen:

Rohstoffe.

100 l durch Rühren defibriniertes Blut von Kälbern oder jungen Rindern (bis max. 3 Jahre alt)

20 1 l aktivierte Papainlösung

HCl 1 N

Äthanol 96 %

aqua dest. ad. injectionem

Inkubation: Das aufgetaute Blut wird im Inkubationskessel auf 37°C erwärmt, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird die Inkubationslösung zugegeben und man läßt 14 bis 18 h inkubieren. Das fertig inkubierte Blut wird mit frischem a.d. 1:1 verdünnt und für die anschließende Ultrafiltration vorfiltriert.

30 Vorfiltration: Teilchengröße  $\leq 50 \mu\text{m}$ ; Gerät: Seitz Plattenfilteranlage für 7 Filterschichten Seitz Supra 300.

Ultrafiltration: Gerät: Millipore Ultrafilter, Filterfläche: 4,6  $\text{m}^2$ , NMG 10.000

Ausgangsvolumen:  $\sim 200$  l; Durchflußrate:  $\sim 0,7$  l/min.

35 Das Konzentrat wird bei  $\sim 60$  l mit 30 l a.d. verdünnt und man filtert nochmals bis auf  $\sim 20$  - 25 l Retentat. Gesamtfiltrationsvolumen: 205 - 210 l. Nach 30, 100 und 200 l Permeat werden jeweils Proben zur Überprüfung der Filterdichtheit mittels TCA-Fällung (muß negativ sein!) gezogen.

1 Einengung im Verdampfer: Das Ultrafiltrat wird so rasch als möglich im Verdampfer bei 60 - 80°C auf 3 - 4 l Endvolumen unter Vakuum aufkonzentriert (Aufkonzentrierung auf  $\frac{1}{25}$  -  $\frac{1}{33}$  des ursprünglichen Blutvolumens). Dabei kommt es zu starken Ausfällungen, die über ein  
5 Schwarzbandfilter abfiltriert werden. Man konzentriert so hoch, um die Wahrscheinlichkeit von Nachfällungen zu verringern.

Äthanolfällung: Das filtrierte Konzentrat wird nun in die 2,5-fache Menge (10 l) vorgekühlten Äthanol 96 Vol.-% eingerührt und in der Kälte (Kühlraumtemperatur: 4 - 6°C) stehenlassen. Nach einer Stehzeit von 48  
10 Stunden wird klarfiltriert.

Verwendete Filter: Schwarzbandfilter, Glasfaservorfilter (Fa. Sartorius) Der zur Fällung zugesetzte Äthanol wird im Rotavapor abdestilliert. Dabei kommt es meist nochmals zu einer Ausfällung. In diesem Falle wird die Klarfiltration über Schwarzband- und Glasfaservorfilter wiederholt.  
15 Durch die starke Einengung vor der Äthanolfällung ist nun nur mehr eine Trockengewichtseinstellung auf 200 mg/ml durch Verdünnung mit der entsprechenden Menge frischen Wasser für Injektionszwecke notwendig.

Das fertige Wirkstoffkonzentrat wird über ein Sterilfilter (0,2 µm Membranfilter, Fa. Sartorius) und nochmals durch ein Ultrafilter (NMGG: 20.000) filtriert und anschließend in sterile Flaschen abgefüllt. Dieses Wirkstoffkonzentrat ist Ausgangsbasis für die Herstellung von Ampullen, Infusionslösungen, Tabletten, Dragees, Kapseln, Salben, Gels usw. Bevorzugte galenische Formen sind Pulver oder Granulate, die in Hart- oder Weichgelatinekapseln abgefüllt sind.

25 Beispiel 1:

10 1 Rinderblut werden am Schlachthof durch Rühren defibriniert. Die Fibrinflocken werden durch ein Sieb abfiltriert. Das Blut wird in kleinen Portionen (4 - 5 l) eingefroren und erst kurz vor der Verarbeitung wieder aufgetaut. Zur Inkubation wird der pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt, mit 20 g vorbehandeltem aktiviertem Papain versetzt und 15 Stunden bei 37°C unter Rühren stehengelassen. Die Vorbehandlung des Papains dient der Reinigung von handelsüblichem Papain (z.B. Papayotin, Fa. Extrakt-Chemie, 80.000 E/g). 20 g handelsübliches Papain werden in 200 ml a.d. suspendiert und anschließend wird zentrifugiert. Der Überstand wird für die anschließende Ultrafiltration vorfiltriert. Die Lösung soll frei von Teilchen > 10 µm sein. Bei der Ultrafiltration wird bis auf 50 ml Konzentrat filtriert und anschließend zur

1. Aktivierung des Papains mit Cysteinlösung (300 mg Cystein in 150 ml a.d.) verdünnt auf insgesamt 200 ml. Das Ultrafiltrat wird verworfen. Das inkubierte Blut wird in 10 l vorgekühltes destilliertes Wasser ge-  
 5 rührt. Das verdünnte Blut wird für die Ultratiltration über eine Plat-  
 tenfilteranlage für 7 Filterschichten vorfiltriert und anschließend durch ein Ultrafilter mit einer Molekulargewichtsgrenze von 10.000 Dalton filtriert und sofort auf 360 ml eingeengt. Die durch das Aufkonzentrieren ausgefallenen Substanzen werden durch Filtration über ein Schwarzbandfilter abgetrennt. Das eiweißfreie Filtrat wird in 900 ml  
 10. vorgekühltem Äthanol 96% eingerührt und im Kühlschrank bei 7°C stehengelassen. Die Überprüfung auf Eiweißfreiheit erfolgt im Schnelltest mit Trichloressigsäure. Nach mindestens 48 Stunden Stehzeit werden die Ausfällungen abfiltriert und der Alkohol im Rotavapor abgezogen.

15 Das so erhaltene Produkt wird mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser auf einen Trockensubstanzgehalt von 200 mg/ml verdünnt und aseptisch in sterile Flaschen abgefüllt.

Analysendaten:

pH-Wert	6,1
Dichte (g/ml.)	1,0760
Chlorid*	2,56
Natrium*	1,94
Kalium*	0,16
Ausbeute*	10,9
Osmolalität (mosm/kg)	3.110
Aktivität (Warburg)**	+ 32,1 %
SDS -Elektrophorese: frei von Substanzen mit MG > 10.000	

\* g aus 1 kg Blut  
 \*\* Differenz gegen Referenzstandard

Beispiel 2

50 l Kälberblut werden am Schlachthof durch Röhren defibriniert. Die Fibrinflocken werden durch ein Sieb abfiltriert. Das Blut wird sofort wie in Beispiel 1 aufgearbeitet.

Analysendaten:

pH-Wert	6,0
Dichte (g/ml)	1,0840

1	Chlorid *	2,28
	Natrium*	1,60
	Kalium*	0,14
	Ausbeute*	8,3
5	Osmolalität (mosm/kg)	3.725
	Aktivität (Warburg)**	35,8 %

SDS Elektrophorese: frei von Substanzen mit MG > 10.000

\* g aus 1 kg Blut

\*\*Differenz gegen Referenzstandard

10. Beispiel 3:

10.1 Rinderblut werden am Schlachthof durch Rühren defibriniert. Die Fibrinflocken werden durch ein Sieb abfiltriert. Anschließend wird mit HCl der pH-Wert auf 7,1 eingestellt, mit 20 g gemäß Beispiel 1 vorbehandeltem aktivierten Papain 14 Stunden bei 37°C inkubiert und das inkubierte Blut mit dest. Wasser 1:1 verdünnt. Zur Abtrennung aller Teilchen > 10 µm wird durch ein Plattenfilter vorfiltriert und anschließend erfolgt eine Ultrafiltration bei einer Abscheidegrenze von 10.000 Dalton. Das eiweißfreie Ultrafiltrat (überprüft mittels Fällung mit Trichloressigsäure) wird im Rotationsverdampfer auf ca. 350 ml eingeengt, mit 900 ml Äthanol versetzt und 48 Stunden im Kühlschrank gelagert. Die ausgefallenen Substanzen werden durch Filtration abgetrennt und der Alkohol wird im Vakuumverdampfer abdestilliert. Dieses Konzentrat wird auf 400 ml verdünnt sterilfiltriert und aseptisch in Ampullen abgefüllt.

25. Analysendaten:

pH-Wert	6,1
Dichte (g/ml)	1,0912
Chlorid*	1,68
Natrium *	1,19
30. Kalium*	0,11
Ausbeute	6,0
Osmolalität (mosm/kg)	3.635
Aktivität (Warburg)**	28,3 %
SDS-Elektrophorese: frei von Substanzen mit MG > 10.000	
35. * g aus 1 kg Blut	
** Differenz gegen Referenzstandard	

1      Beispiel 4:

10 l defibriniertes frisches Rinderblut wird mit HCl auf pH 6,5 eingestellt, mit 20 g gemäß Beispiel 1 vorbehandeltem aktivierten Papain bei Raumtemperatur 18 Stunden inkubiert und anschließend unverdünnt ultrafiltriert. Das eiweißfreie Ultrafiltrat wird im Vakuumverdampfer auf 300 ml aufkonzentriert, mit 0,75 l Äthanol versetzt und anschließend 24 Stunden im Kühlschrank gelagert. Der Niederschlag wird durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt und der Alkohol im Rotavapor abgedampft. Das Konzentrat wird mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser auf 200 mg Trockensubstanz/ml eingestellt und in sterile Flaschen abgefüllt.

10      Beispiel 5:

Das gemäß Beispiel 1 bis 4 hergestellte Konzentrat wird mit Aqua ad inject. auf 40 mg/ml verdünnt, der pH-Wert nochmals Überprüft bzw. auf 6,9 eingestellt und nochmals zur Entpyrogenisierung mit einem Ultrafilter mit einer Abscheidegrenze bei MG 10.000 filtriert. Diese Injektionslösung wird unter aseptischen Bedingungen in 2 ml, 5 ml bzw. 10 ml Ampullen abgefüllt.

15      Beispiel 6:

Das laut Beispiel 1 bis 4 hergestellte Konzentrat wird mit Aqua ad inject. auf einen Trockenstoffgehalt von 50 - 70 mg/ml eingestellt und lyophilisiert. Tabletten werden hergestellt, indem

20      500,0 glyophilisiert. Konzentrat

1.987,5 g Methylcellulose

25      12,5 g Mg-Stearat

vermischt und zu 250 mg Tabletten verpreßt werden. Da das lyophilisierte Konzentrat extrem hygroskopisch ist, muß die Tablettierung unter trockener Raumluft (<20 % relative Feuchte) erfolgen. Die Kerne werden mit einem speichelresistenten, weißen Film überzogen, indem für 750 g Kerne

30      300 g Sprühlösung bestehend aus:

12,0 g Eudragit E 100

1,5 g Polyäthylenglykol 6.000

91,8 g Opaspray white, K 1-7000 (50 % Feststoffanteil, Fa. Colorcon)

97,5 g Isopropanol

97,5 g Methylenchlorid

35      aufgesprührt werden.

Beispiel 7:

1,25 l des laut Beispiel 1 bis 4 herstellten Konzentrats werden auf 1 kg Granulat bestehend aus 98 % Methylcellulose und 2 % Gelatine, sehr lang-

- 1 sam aufgesprührt. Das so erhaltene Granulat wird bei 60°C in einem Trockenschrank mit Umluft für mindestens 18 Stunden nachgetrocknet. Nach Erreichen einer Restfeuchte von max. 0,5 % wird das Granulat mit 0,5 % Mg-Stearat vermischt und zu 250 mg Tabletten verpreßt.
- 5 Die Tabletten werden analog Beispiel 6 überzogen.

Beispiel 8:

Für die Herstellung eines Wundgels mit einem Trockenstoffgehalt des nach Beispiel 1 bis 4 hergestellten Wirkstoffkonzentrats von 8 mg/g Gel werden

10	1. 75,0 g Methylcellulose 4.000 cps
	2. 210,0 g Propylenglykol
	3. 90,0 g Polyäthylenglykol
	4. 120,0 ml Wirkstoffkonzentrat
	5. 4,5 g p-OH Benzoesäuremethylester
15	6. 0,9 g p-OH Benzoesäurepropylester
	7. 2.496,6 g Aqua dest.

derart zu einem Gel verarbeitet, daß von 1., 2. und 3. eine Dispersion hergestellt wird und diese in 1.800 ml heiße wässrige Phase (worin 5. und 6. gelöst sind) eingearbeitet wird. Mit dem restlichen H<sub>2</sub>O wird das .  
20 Wirkstoffkonzentrat verdünnt, sterilfiltriert und dem Gel bei 50°C Ab- kühlttemperatur hinzugefügt.

25

30

35

1

## P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Herstellung eines therapeutisch aktiven, insbesondere zur Wundheilung oder zur Behandlung in der Geriatrie verwendbaren Wirkstoffes, bei welchem defibriniertes Blut von warmblütigen Säugetieren, insbesondere von jungen Rindern oder Kälbern, einer enzymatischen Hydrolyse mit Papain unterworfen, filtriert, das Permeat eingeengt und mit Alkohol, vorzugsweise Äthanol, behandelt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Papainhydrolyse an unhämolysiertem Blut mit aktiviertem Papain bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,4 vorgenommen wird, daß anschließend die Reaktion durch Abkühlung gestoppt wird, daß zur Entproteinisierung und zur Entfernung des Papains bis 10.000 D ultrafiltriert wird und daß sodann das im Wesentlichen proteinfreie Permeat auf 1/25 bis 1/35, bezogen auf das eingesetzte Blut, eingeengt, mit Alkohol versetzt mindestens 24 Stunden gekühlt stehengelassen und schließlich klarfiltriert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die klarfiltrierte Mischung auf eine vorbestimmte Konzentration, z.B. 200 mg/ml, mit destilliertem Wasser verdünnt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß aus der klarfiltrierten Mischung der Alkohol entfernt wird, vorzugsweise durch Abdampfung.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Abstoppung der Reaktion durch Verdünnung mit kaltem destilliertem Wasser vorgenommen wird, vorzugsweise mit einer Temperatur von 0 bis 5°C.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Verdünnung im Ausmaß von etwa 1:1 vorgenommen wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Ultrafiltration eine Vorfiltration zur Abscheidung von Teilchen mit einer Größe von mehr als 50µm vorgenommen wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Einengung des Permeates in einem Vakuumverdampfer bei einer Temperatur von 60 bis 80°C durchgeführt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Alkoholzusatz nochmals eine Filtration erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkoholzusatz im Ausmaß von etwa 65 bis 80

I Vol.-%, vorzugsweise etwa 70 Vol.-% der entstehenden Mischung erfolgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung bei einer Temperatur von 4 bis 6°C stehen gelassen wird.

5 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß für die Papainhydrolyse das Papain durch Ultrafiltration von Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 10.000 befreit und mit Cystein aktiviert wird.

10. 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Papainhydrolyse bei einem pH-Wert von etwa 7 und einer Temperatur von etwa 37°C während 14 bis 18 Stunden erfolgt.

15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Stehzeit nach der Alkoholfällung 24 bis 55 Stunden, vorzugsweise etwa 48 Stunden beträgt.

15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die klarfiltrierte Mischung nach Verdünnung nochmals sterilfiltriert und bzw. oder ultrafiltriert wird.

20 15. Wirkstoff, insbesondere für die Wundheilung oder zur Behandlung der Geriatrie, hergestellt mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

25 16. Verfahren zur Herstellung therapeutischer Präparate, insbesondere zur Wundheilung oder für die Geriatrie, dadurch gekennzeichnet, daß man nach einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestellte Konzentrate zu Injektionslösungen, Tabletten, Dragees oder Wundsalben oder -gelen verarbeitet.

30 17. Therapeutisches Präparat, insbesondere Wundheilmittel oder geriatrische Präparate, enthaltend ein nach einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestelltes Konzentrat.

1 / 2

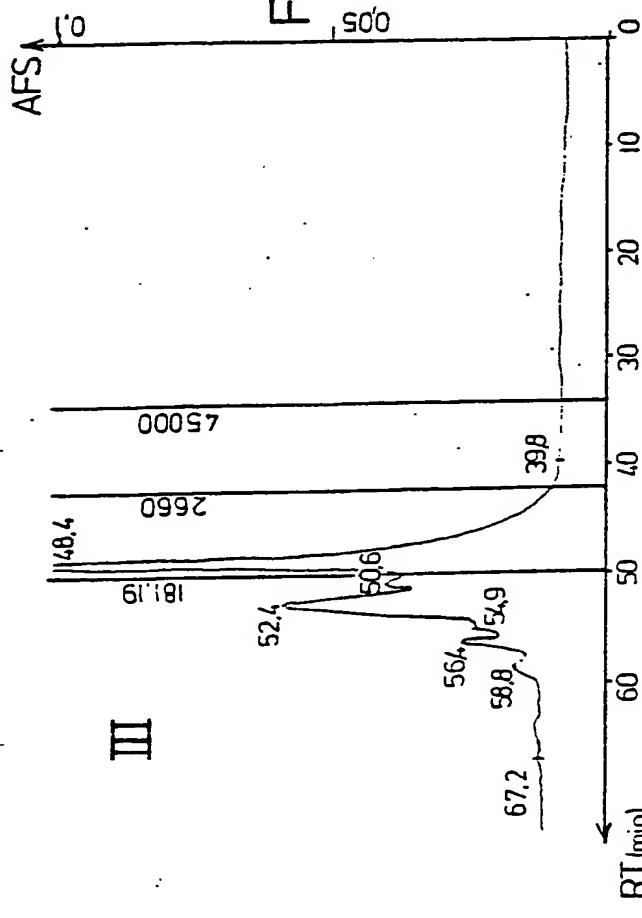
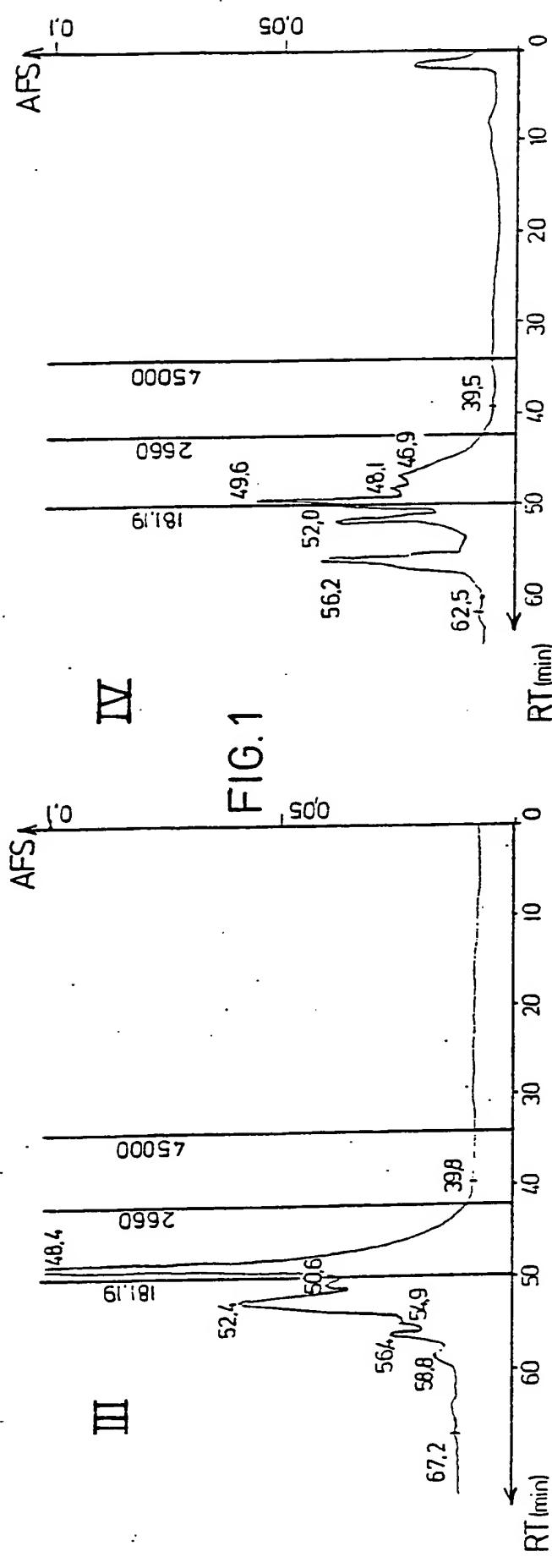
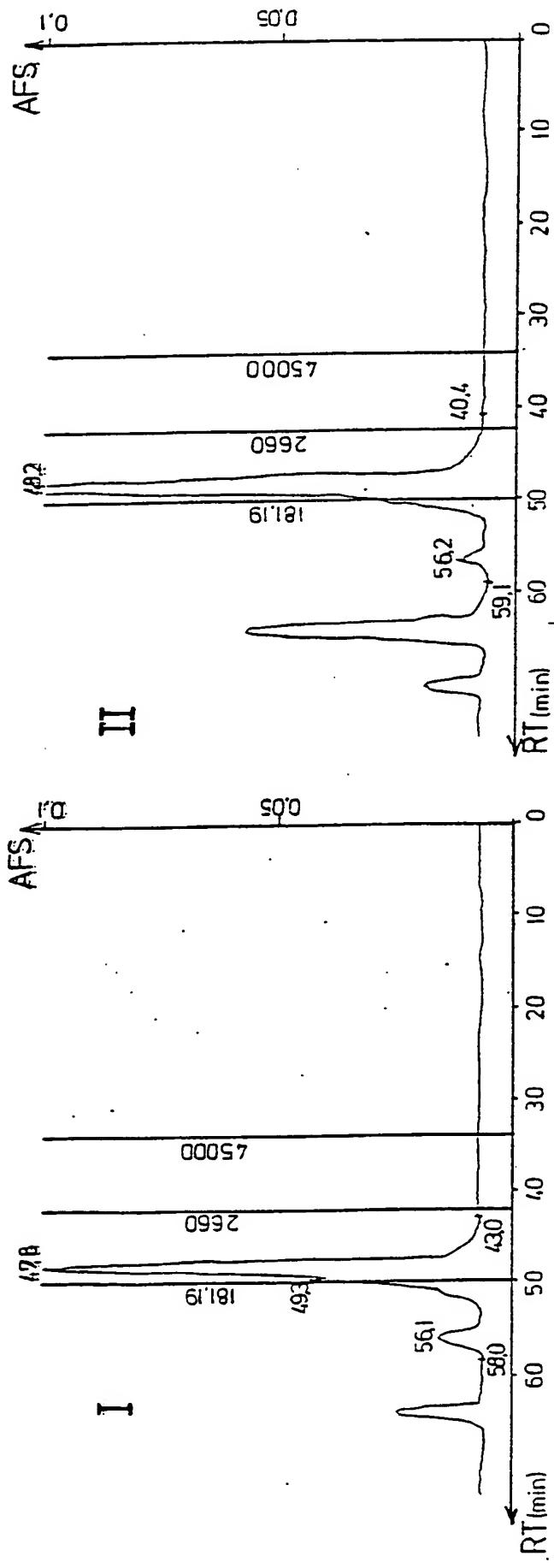


FIG. 3

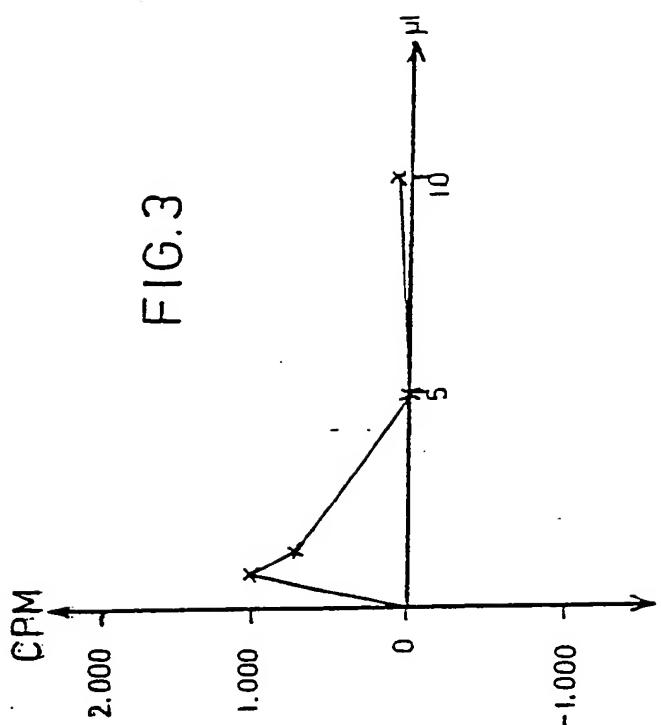


FIG. 2

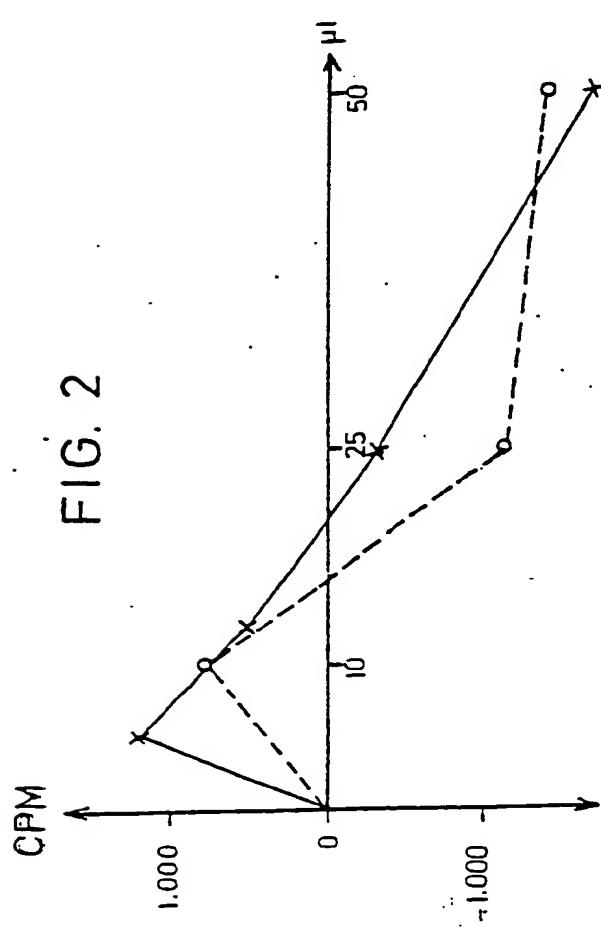


FIG. 6

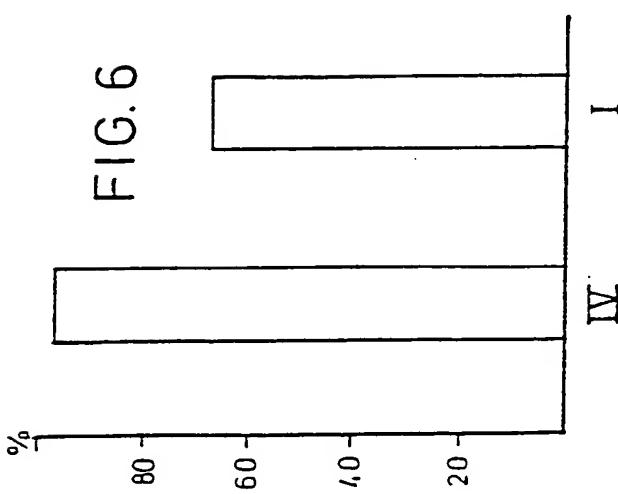


FIG. 5

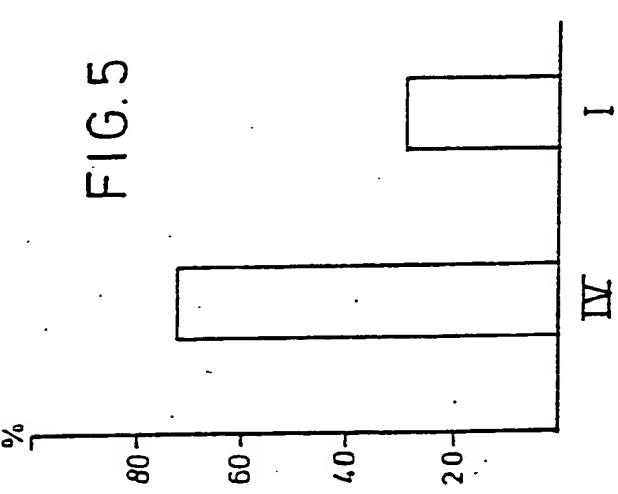
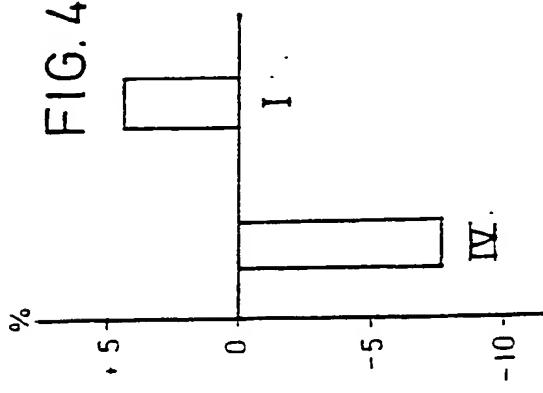


FIG. 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/AT 89/00003

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl<sup>4</sup> : A 61 K 35/24

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl <sup>4</sup>	A 61 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched \*

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT\*

Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	EP,A,0038511 (CHEMISCHES INSTITUT SCHÄFER AG ORGAN. CHEM. LABORATORIUM FÜR INDUSTRIELLE FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG) 28 October 1981 cited in the application --	
A	EP,A,0095170 (SOLCO BASEL AG) 30 November 1983 cited in the application --	
A	GB,A,1288242 (INSTITUTO NAZIONALE CHEMICO BIOLOGICO S.R.L.) 06 September 1972 cited in the application & DE,A,1949195 --	
A	US,A,2912359 (LUDWIK ANIGSTEIN et al.) 10 November 1959 cited in the application --	
A	EP,A,0140134 (SOLCO BASEL AG) 08 May 1985 cited in the application --	
A	BE,A,553356 (SOLCO BASEL AG) 15 Janaury 1960 --	

- \* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
07 April 1989 (07.04.89)	28 April 1989 (28.04.89)
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. AT 8900003**  
**SA 26179**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 24/04/89. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0038511	28-10-81	JP-A- 57038716 CA-A- 1168980 AT-B- E11224	03-03-82 12-06-84 15-02-85
EP-A- 0095170	30-11-83	FR-A, B 2527079 DE-A- 3219248 JP-A- 58210021 GB-A, B 2130088 US-A- 4599176 CH-B- 663539	25-11-83 24-11-83 07-12-83 31-05-84 08-07-86 31-12-87
GB-A- 1288242	06-09-72	NL-A- 6914542 DE-A- 1949195 FR-A- 2022429 CH-A- 518099 US-A- 3672954 BE-A- 740639 OA-A- 3135	06-05-70 30-07-70 31-07-70 31-01-72 27-06-72 01-04-70 15-12-70
US-A- 2912359			
EP-A- 0140134	08-05-85	AU-A- 3369384 JP-A- 60214738 US-A- 4576696 AU-B- 568265 CA-A- 1230553	18-04-85 28-10-85 18-03-86 17-12-87 22-12-87
BE-A- 553356			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 89/0000

## I. KLASSEKIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)<sup>6</sup>

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int. Cl. 4 A 61 K 35/14

## II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup>

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int. Cl. 4	A 61 K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup>

## III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup>

Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
A	EP, A, 0038511 (CHEMISCHES INSTITUT SCHÄFER AG ORGAN. CHEM. LABORATORIUM FÜR INDUSTRIELLE FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG) 28. Oktober 1981 in der Anmeldung erwähnt --	
A	EP, A, 0095170 (SOLCO BASEL AG) 30. November 1983 in der Anmeldung erwähnt --	
A	GB, A, 1288242 (INSTITUTO NAZIONALE CHEMICO BIOLOGICO S.R.L.) 6. September 1972 in der Anmeldung erwähnt & DE, A, 1949195 --	
A	US, A, 2912359 (LUDWIK ANIGSTEIN et al.) 10. November 1959 in der Anmeldung erwähnt -- --	
		./.

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naneliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

## IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. April 1989

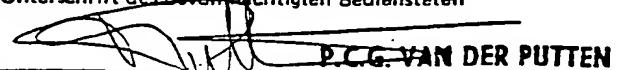
Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28 APR 1989

Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt

Unterschrift des bevoilichtigten Bediensteten

  
P.C.G. VAN DER PUTTEN

## III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP, A, 0140134 (SOLCO BASEL AG) 8. Mai 1985 in der Anmeldung erwähnt --	
A	BE, A, 553356 (SOLCO BASEL AG) 15. Januar 1960 -----	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

AT 8900003  
SA 26179

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 24/04/89.  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0038511	28-10-81	JP-A-	57038716	03-03-82
		CA-A-	1168980	12-06-84
		AT-B-	E11224	15-02-85
EP-A- 0095170	30-11-83	FR-A, B	2527079	25-11-83
		DE-A-	3219248	24-11-83
		JP-A-	58210021	07-12-83
		GB-A, B	2130088	31-05-84
		US-A-	4599176	08-07-86
		CH-B-	663539	31-12-87
GB-A- 1288242	06-09-72	NL-A-	6914542	06-05-70
		DE-A-	1949195	30-07-70
		FR-A-	2022429	31-07-70
		CH-A-	518099	31-01-72
		US-A-	3672954	27-06-72
		BE-A-	740639	01-04-70
		OA-A-	3135	15-12-70
US-A- 2912359		Keine		
EP-A- 0140134	08-05-85	AU-A-	3369384	18-04-85
		JP-A-	60214738	28-10-85
		US-A-	4576696	18-03-86
		AU-B-	568265	17-12-87
		CA-A-	1230553	22-12-87
BE-A- 553356		Keine		

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82